

ガラクトーゼ負荷試験に関する研究 第一報 ガラクトーゼ定量法の吟味 第二報 網内系?塞剤並びに刺激剤及び肝臓毒による影響について

著者	当麻 忠
号	16
発行年	1959
URL	http://hdl.handle.net/10097/17528

氏 名 当 麻 忠

授 与 学 位 医 学 博 士

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 34 年 7 月 8 日

学 位 授 与 の 根 拠 法 規 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項

研 究 科 , 専 攻 の 名 称 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科

学 位 論 文 題 目 ガラクトーゼ負荷試験に関する研究

第一報 ガラクトーゼ定量法の吟味

第二報 網内系填塞剤並びに刺激剤及び肝臓毒による
影響について

指 導 教 官 東 北 大 学 教 授 山 形 敏 一

論 文 審 査 委 員 東 北 大 学 教 授 山 形 敏 一

東 北 大 学 教 授 鳥 飼 竜 生

東 北 大 学 教 授 中 村 隆

論文内容要旨

第 1 報 ガラクトーゼ定量法の吟味

I. 緒 言

最近、我が国においても酸素の存在のもとで葡萄糖をグルコン酸にする触媒作用を有する酵素が純粋に分離され発売されるようになった。そこで私は此の酵素を用いて、2, 3 の実験を行つたので次に報告する。

II. 実 験 方 法

本実験における糖定量は Somogyi-Nelson 法によつた。ガラクトーゼ定量に際して銅試薬を加えた後の煮沸時間は、25 分で最大還元値に達したので、25 分を用いた。葡萄糖及びガラクトーゼの基準液により検量曲線を作成し、それにより糖量を決定した。

グルコース・オキシダーゼは長瀬産業より発売された“デオキシシン”を 1 mg/cc 溶液にして用いた。盲検は糖液と同じ様にグルコース・オキシダーゼ溶液 1 cc を加えて、同じ操作を行つた。除蛋白はグルコース・オキシダーゼ作用後行つた。

III. 実 験 成 績

1) 葡萄糖、ガラクトーゼ及び血糖に対するグルコース・オキシダーゼの作用 (第 1 表)

第 1 表 葡萄糖、ガラクトーゼ及び血糖に対する
グルコース・オキシダーゼの作用

39°C に於ける作用時間 (分)	40	60	90	120
80 mg/dl 葡萄糖溶液 (mg/dl)	4	0	0	0
68 mg/dl ガラクトーゼ溶液 (mg/dl)	66	65	64	65
191 mg/dl の血液* (mg/dl)	6	0	0	0

* 糖尿病患者の血液

第 2 表 39°C, 60 分オキシダーゼ作用時に於ける種々濃度ガラクトーゼ溶液、ガラクトーゼ附加血液及びガラクトーゼ溶液に硫酸亜鉛・水酸化バリウムによる除蛋白操作を加えた場合のガラクトーゼ検出量

作用前ガラクトーゼ濃度 (mg/dl) 血液の時附加「ガ」量	ガラクトーゼ溶液		ガラクトーゼ附加血液		ガラクトーゼ溶液に除蛋白操作を行つた場合	
	検出量 (mg/dl)	検出率 (%)	検出量 (mg/dl)	検出率 (%)	検出量 (mg/dl)	検出率 (%)
46	44	95.7				
68	66	97.1	65	95.6	65	95.6
77	74	96.1	74	96.1	74	96.1
166	161	97.0			159	95.8
平 均		96.5		95.9		95.8

葡萄糖，ガラクトーゼの各溶液及び血糖に対するグルコース・オキシダーゼの作用は，葡萄糖及び血糖はグルコース・オキシダーゼにより 60 分で完全に酸化されたが，ガラクトーゼは 40 分から 120 分の間に殆んど変化をみない。

2) グルコース・オキシターゼ作用時におけるガラクトーゼ検出率 (第 2 表)

種々の濃度のガラクトーゼ溶液にグルコース・オキシターゼを作用させた場合のガラクトーゼの検出率は，95.7%~97.1% を示し誤差を考慮すると変化がないと云い得る。

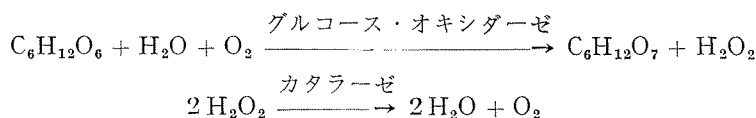
3) Somogyi の除蛋白操作の影響 (第 2 表)

Somogyi の除蛋白操作の影響は，ガラクトーゼ溶液のみの場合と，除蛋白操作を行つた場合とを比較してみると，その影響はみられないと云い得る。又血液にグルコース・オキシダーゼを作用し，除蛋白操作を行つた場合にも同様にその影響はみられない。

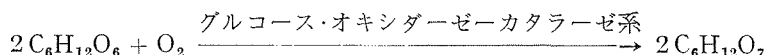
IV. 総括並びに考按

グルコース・オキシダーゼは Müller が発見し命名したが，その後，Notatin, Penicillin B, Penatin, glucose dehydrogenase 等と呼ばれたが，Underkofler は正確には β -D-glucopyranose aerodehydrogenase であると云い，便宜上簡単な glucose oxidase の名を用いている。

此の酵素の葡萄糖に対する反応は



したがって



の反応式で示される。

グルコース・オキシダーゼは，水溶性で，pH 2~8 で活性を示し，至適 pH は 5.6，至適温度は 39°C であると云われる。私の用いたグルコース・オキシダーゼ (デオキシシ) は pH 3.5~7.5 の範囲に活性を持ち，pH 5.3~6.0 が最適であり，30°~50°C がその至適作用温度である。それで，此の実験には 39°C を採用した。なお，蒸留水中に検液及びグルコース・オキシダーゼ溶液を加えたのであるが，その pH は 5.6~6.0 を示したため，特別に緩衝液を用いずに，前表のような成績を得た。

Coulthard 等及び Tygstrup 等はグルコース・オキシターゼはガラクトーゼに作用しないと云っているが，van Bruggen 等はガラクトーゼも作用をうけると述べている。Keilin 等は市販のガラクトーゼは葡萄糖が混入している事を示し，ガラクトーゼの酸化は葡萄糖の 0.14% であると報告した。

第 2 表から種々の濃度のガラクトーゼ検出率は，ほぼ一定の値を示し平均 96.5% である。これは第 1 表における様にガラクトーゼを継時的に 120 分迄定量した成績より考え，恐らく大部分は不純な葡萄糖の混入が原因している様に思われる。然し乍ら此の実験結果は一定の条件のもとにグルコース・オキシダーゼを作用させた場合にはガラクトーゼの検出率は一定である事を示している。従つて種々濃度のガラクトーゼ規準液に一定量のグルコース・オキシダーゼを作用させて標準曲線を作成しておけば，その標準曲線から直ちにガラクトーゼ濃度を知る事が出来る。此の様に Tygstrup 等の様に Somogyi の変法を用いる事なく，そのまま使用出来る。又前述の式に示した様に，グルコース・オキシダーゼの作用に際して O_2 を必要とする為，従来通気をしたり，或いは振盪をしたりして O_2 の供給を行つたが，私は特別にかかる操作を行う事なく，グルコース・オキシダーゼ溶液を加えた後に強く振盪混和して，39°C に保つだけで充分に葡萄糖の酸化除去を完了した。更にグルコース・オキシダーゼは水に易溶性であり，その純粋な

ものを使用する時は、酵母法に際して酵母を葡萄糖液に添加する都度再三洗滌してその浮遊液を作る様な操作を必要としない点で酵母法より優る。

以上述べた事から血中に負荷されたガラクトーゼを測定する為に次の方法を採用した。すなわち、蒸留水中に血液 0.1 cc 或いは 0.2 cc 注入し、それに 1 mg/cc グルコース・オキシダーゼ溶液 1 cc を加え、振盪混和後、39°C 60 分間放置する。その後除蛋白を行い、その除蛋白濾液、或いは遠心沈澱後の上澄液に銅試薬を加え沸騰水中に 25 分間つけ、冷却後 Nelson 呈色試薬を加え、強く振盪した後、水でうすめて比色する。比色計の読みで、あらかじめ規準液で作成しておいた標準曲線よりガラクトーゼ濃度を求める。なお、盲検用には、ガラクトーゼ負荷前血液について同じ様な操作を行つたものを用いた。

第 2 報 網内系填塞並びに刺激剤及び肝臓毒による影響について

I. 緒 言

網内系が含水炭素代謝に関与する事は古くから知られて来た。ガラクトーゼは Shay 等, Bollman 等により主として肝臓において処理されると云われている。しかるに山形教授は肝臓の機能は肝実質細胞と星細胞との機能の総和であると述べているが、ガラクトーゼ負荷試験に対して肝臓における肝実質細胞と星細胞とが如何なる役割を演じているかを知ることは極めて重要なことである。依つて私は網内系を填塞または刺激した後、ガラクトーゼ負荷試験を行いそれに対する網内系の影響を検討した。

又従来静脈内投与によるガラクトーゼ負荷試験の成績判定には、種々の方法が行われているので、私は種々の肝臓毒を用いて肝障害を起した後、ガラクトーゼ負荷試験を行い、数種の成績判定法を検討した。

II. 実 験 方 法

実験動物は体重 2 kg 前後の健康成熟家兎を用い、一定期間豆腐糟を以つて、一定場所に飼養し、実験前 20 時間絶食させ実験条件を一定にした。ガラクトーゼ投与量は体重毎 kg 0.5 g の割合で 50% ガラクトーゼ溶液として耳殻周辺静脈より注射し、注射前及び注射後 15 分, 30 分, 60 分, 90 分, 120 分と 2 時間に亘り他側耳殻周辺静脈より採血した。

血糖定量法は前報で述べた方法によつた。

また家兎における個体差を考え各例毎に第 1 回試験を無処置で行い、数日後に填塞剤並びに刺激剤及び肝臓毒を投与して第 2 回試験を行つた。

III. 実 験 成 績

1. 対 照 試 験 (第 3 表)

第 1 回ガラクトーゼ負荷試験を行い、数日後に第 2 回試験を行つたが、各例共全血糖及びガラクトーゼ濃度に大差はみられなかつた。

2. 網内系填塞試験 (第 3 表)

1) 墨汁試験 墨汁は網内系填塞剤として広く使われているが、山形によれば墨汁注射後、網内系機能は低下すると云われる。3% 墨汁(古梅園製紅花墨の生理的食塩水溶液)を毎 kg 10cc 静注後 5 時間目に第 2 回試験を行つた。その成績では、空腹時血糖の上昇、「ガ」指数の増加、G. R. C. の低下がみられ、ガラクトーゼ処理能の著明な減退がうかがわれる。8 時間後に検してみると、その程度が軽減した。

第3表 対照試験及び網内系壊塞並びに刺激試験 (各々平均値)

試験法	処置	全血					糖 (mg/dl)			葡萄糖濃度 (mg/dl)					ガラクトーゼ濃度 (mg/dl)					「ガ」* 指数	「ガ」* 残留値	G.R.C.* (%/min)	消失率* (%)
							最大差*		最小差*														
		前値	15'	30'	60'	90'	120'			15'	30'	60'	90'	120'	15'	30'	60'	90'	120'				
対試 照験	第1回	93	179	158	133	117	109	86	16	108	108	107	104	100	88	63	34	17	9	123	26	2.2	80.7
	第2回	95	182	164	137	118	112	87	17	117	118	112	104	106	80	56	33	18	8	115	26	2.0	77.5
墨汁 試験	無処置	89	157	129	104	93	99	68	4	108	104	101	93	99	61	34	4	0	0	38	0	93.4	3.6
	注射5 時間後	132	190	170	128	98	99	68	-34	133	134	112	98	99	72	46	22	0	0	68	0	69.4	1.6
	無処置	102	180	165	125	104	107	78	2	102	114	110	100	107	95	66	20	6	0	92	6	93.7	3.7
	洋射8 時間後	70	144	118	93	80	79	74	9	80	77	81	73	79	81	54	17	10	0	81	10	87.7	2.8
コ銀 ロイ 試験	無処置	80	154	143	112	98	94	74	14	98	103	94	94	94	70	51	24	6	0	81	6	91.4	3.3
	注射5 時間後	89	151	127	106	95	92	62	3	97	91	88	88	92	68	46	23	6	0	75	6	91.2	3.2
コン ム試 験	無処置	100	189	162	133	112	109	89	9	111	110	110	101	109	94	66	31	14	0	111	14	85.1	2.5
	注射5 時間後	95	186	151	125	106	99	91	4	118	113	112	104	99	83	47	17	4	0	68	4	95.2	4.0
ハイ 試験	無処置	97	175	151	132	117	102	78	5	114	112	109	108	100	76	50	31	13	4	98	17	82.9	2.4
	注射5 時間後	105	190	159	132	115	104	85	-1	122	120	119	108	104	84	44	20	8	0	72	8	90.5	3.1

最大差=15分値-前値

最小差=最低血糖値-前値

「ガ」指数=30分値+60分値+90分値+120分値

「ガ」残留値=90分値+120分値

G.R.C. } 15分, 90分における
消失率

第4表 肝 障 害 試 験 (各々平均値)

試験法	処置	全 血					糖 (mg/dl)					葡 萄 糖 濃 度 (mg/dl)					ガラクトーゼ濃度 (mg/dl)					「ガ」 指数	「ガ」 残置値	G.R.C. (%/min)	消失率 (%)			
		前 値					最大差					最小差																
		15'	30'	60'	90'	120'	120'	90'	60'	30'	15'	120'	90'	60'	30'	15'	120'	90'	60'	30'	15'							
グル クロ ム試 験	無処置	112	189	155	125	113	111	77	-1						121	107	113	111	111	83	60	15	4	0	79	4	4.0	95.2
	注射20 時間後	68	153	139	117	102	101	85	33						83	85	85	83	86	87	68	41	26	20	155	46	1.6	70.1
四素 塩炭 酸試 験	無処置	92	169	146	123	106	98	77	6						102	104	105	104	98	84	54	24	4	0	82	4	4.0	95.2
	注射24 時間後	69	149	135	116	99	86	80	17						77	89	83	85	80	85	59	44	18	12	133	30	2.1	78.8
黄試 験	無処置	106	194	167	129	115	111	88	5						119	122	111	113	111	93	58	24	3	0	85	3	4.6	96.8
	注射47 時間後	103	180	158	140	126	116	77	13						116	116	116	113	114	79	54	31	17	4	106	21	2.0	78.5

2) コロイド銀試験 コロイド銀も網内系填塞剤として古くから使用されて来たが、山形によればコロイド銀注射により網内系機能は低下すると云われる。1% コロイド銀の生理的食塩水溶液を毎 kg 10 cc 静注後 5 時間目に第 2 回試験を行つた。その成績では、空腹時血糖の上昇をみとめたが、「ガ」指数、G. R. C. に著変はみられなかつた。

3. 網内系刺激試験 (第 3 表)

1) コンムニン試験 山形によればコンムニン注射により網内系機能は亢進せられる。コンムニン毎 kg 1 cc 背部皮下に注射し 5 時間後に第 2 回試験を行つた。その成績では、空腹時血糖の軽度減少、「ガ」指数の著明な減少、及び G. R. C. の著明な増加がみられ、ガラクトーゼ処理能の明らかな亢進を示した。

2) ハイボン試験 ハイボンが網内系を刺激する事は山形により報告されている。50% ハイボン毎 kg 1 cc 静注し、5 時間後に第 2 回試験を行つた。その成績では、空腹時血糖の増加を示し、「ガ」指数は減少し、G. R. C. は増加を示し、ガラクトーゼ処理能は亢進した。

4. 肝障害試験 (第 4 表)

1) クロロホルム試験 クロロホルムは主として肝小葉中心部に障害を来す。クロロホルム毎 kg 0.25 cc 背部皮下に注射し 20 時間から 24 時間後に第 2 回試験を行つた。その成績では空腹時血糖の低下「ガ」指数の著明な増加と、G. R. C. の著明な減少がみられ、ガラクトーゼ処理能は著明に減退した。

2) 四塩化炭素試験 四塩化炭素は主として肝小葉中心部を障害するが、毎 kg 0.2 cc を背部皮下に注射し、24 時間後に第 2 回試験を行つてみると、空腹時血糖の減少、「ガ」指数の増加及び G. R. C. の減少がみられ、ガラクトーゼ処理能は著明に減退した。

3) 燐 試 験 燐は最初肝小葉周辺部を障害するが次第に肝小葉全体に障害が及ぶと云われる。0.5% 黄燐オリーブ油液毎 kg 0.75 cc を背部皮下に注射し、47 時間前後に第 2 回試験を施行した。その成績では、空腹時血糖の変化は著明でないが、「ガ」指数は増加し、G. R. C. は減少し、ガラクトーゼ処理能は著明な減退を示した。

IV. 総括並びに考按

対照試験では、第 1 回試験後 48 時間或いは 72 時間後に第 2 回試験を行つたが、第 1 回試験に投与したガラクトーゼは第 2 回試験に影響しない成績を得た。

網内系が糖質代謝に関係することは多数の研究者により知られているが、網内系が、ガラクトーゼ負荷試験に及ぼす影響を研究した報告は未だみあたらない。私の実験で墨汁により網内系を填塞すると、5 時間後にガラクトーゼ処理能の明らかな減退を示し、8 時間後にはそれが軽度となつた。コンムニン及びハイボンで網内系を刺激すると、何れもガラクトーゼ処理能は明らかに亢進した。しかるに此等薬剤は山形により、肝細胞機能には殆んど影響を与えず、肝星細胞に影響を与えることが証明されている。且つガラクトーゼは主として肝臓で処理されるので、此の実験成績は肝細胞がガラクトーゼ代謝にも重要な役割を演じていることを物語るものである。

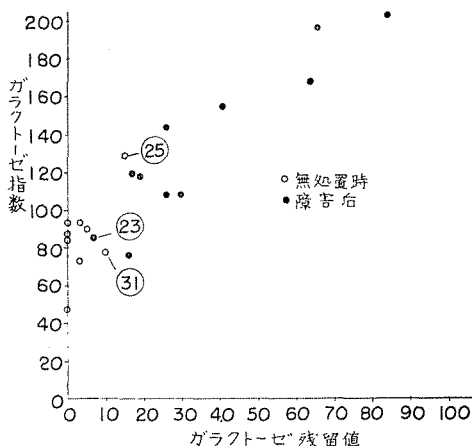
肝臓毒により肝障害を起した場合には、一般に低血糖状態になり、静脈内ガラクトーゼ負荷後、ガラクトーゼに対する同化処理能力が減弱し、負荷ガラクトーゼの血中に残存停滞することが知られている。私の実験に於いても此等と全く同様の成績を得た。しかも、燐、四塩化炭素、クロロホルムの順に機能障害の程度が強くなつた。

ガラクトーゼ負荷試験の成績判定については、現在迄種々の方法が採用されて来た。即ち最初全血糖についてなされたが、ガラクトーゼの定量が出来る様になつてからは、その方法は棄てられた。King 等及び Althausen は或 1 時点におけるガラクトーゼ濃度について行つた。しかるに Colcher 等は血中からの消失過程をみる為に
$$G. R. C. = \frac{2.3 (\log C_1 - \log C_2)}{t_2 - t_1} \times 100 (\%/min)$$

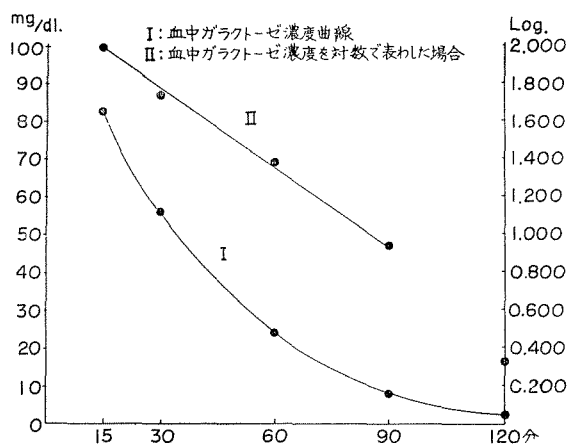
($C_1, C_2=t_1, t_2$ 時間におけるガラクトーゼ濃度) なる式を導き之を Galactose Removal Constant (G. R. C. と略す) と名づけ、之により判定した。又 Maclagan は 30 分, 60 分, 90 分, 120 分における各濃度の総和をガラクトーゼ指数 (「ガ」指数と略す) と名づけ、成績判定に用いた。

全血糖値で障害後最も明らかな差異を示したのは最小差 (最低血糖値-前値) であり、最高血糖値 (15 分値) 及び最大差 (15 分値-前差) については、明らかな差異が認められなかったが、最小差もガラクトーゼ値に比すれば成績判定法として劣る。

ガラクトーゼは肝臓中で葡萄糖に転化されるのであるが、血中葡萄糖の変動には肝障害後に特別な意義は認められなかった。



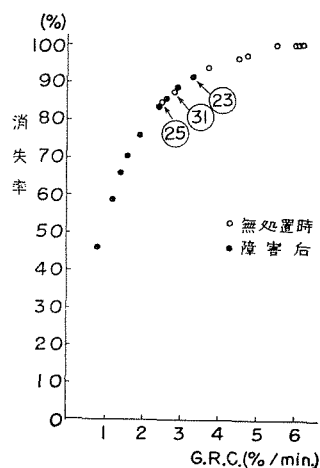
第1図



第2図

或1時点、つまり 90 分或いは 120 分におけるガラクトーゼ濃度は障害後全例に増加を認めるが、成績判定法としては以下の方法より劣る。「ガ」指数では1例を除き障害後高値を示した。一般にガラクトーゼ投与後短時間内では、King 等の実験成績にも示されている様に障害後に低値を示すものがみられる。従つて無処置時にガラクトーゼの血中から消失する2時点におけるガラクトーゼ濃度の和、即ち私の実験では 90 分値+120 分値 (ガラクトーゼ残留値と名づける) を以て判定した方が明確さをもつ事が当然推測される。此の残留値と「ガ」指数との関係は第1図に示した様に正常時と障害時における撒布状態が「ガ」残留値の方により明確に分かれている。次に G. R. C. について検討してみると、無処置家兎全例につき各時間毎のガラクトーゼ濃度の平均値を求め、之を対数で表わしてみると、第2図に示す様に 15 分から 90 分の間では直線となつた。

従つて 15 分と 90 分における G. R. C. を求めた。今 15 分から 90 分における血中からのガラクトーゼの消失率を求め、之を G. R. C. と比較してみると、第3図に示す相関曲線が得られる。その正常時と肝障害時における各例の撒布状態は全く同様である。従つて Colcher 等の如く、対数計算による煩雑さにわずらわされる事なく、消失率を求める事により成績判定に資し得る事となる。第1図及び第2図から個々の例について消失率と残留値とについて検討する



第3図

と、無処置時の 25 号, 31 号家兎, 障害後の 23 号家兎の撤布状態から, 両者を総合して成績判定を行つた方がより妥当である事が察せられる。

静脈内ガラクトーゼ負荷試験による尿中ガラクトーゼ量は, 既に多数の研究者により, その成績判定上の価値が否定されているので, 検討しなかつた。

以上の数種成績判定法を総括すると, 次の事が云われる。

- 1) 全血糖値による判定は, ガラクトーゼ値についての判定法より劣る。
- 2) 或 1 時点におけるガラクトーゼ濃度による方法及び「ガ」指数による方法よりも, 正常時にガラクトーゼの血中消失時間前後の 2 時点におけるガラクトーゼ濃度の和, 即ち「ガ」残留値による方法が優れている。
- 3) G. R. C. と消失率とは, 同等の価値をもつ。従つて計算の容易さから消失率の方が優る。
- 4) 静脈内ガラクトーゼ負荷試験の成績判定には, 「ガ」残留値及び消失率の両者により行う事が最も妥当である。

審 査 結 果 要 旨

第 1 報 ガラクトーゼ定量法の吟味

著者は糖定量法としては Somogyi-Nelson 法を用いたところ、血液及び葡萄糖溶液にグルコース・オキシダーゼを加え、特別に通気をしたり、振盪をしたりせずに、39°C、60 分で血糖及び葡萄糖は完全に酸化除去されたが、ガラクトーゼ溶液は 40 分～120 分の間で増減をみない。種々濃度のガラクトーゼ溶液、ガラクトーゼ附加血液及びガラクトーゼ溶液に除蛋白操作を行った場合について、何れも一定条件下で同一の検出率を示した。従つてガラクトーゼ含有血液にグルコース・オキシダーゼを加え、一定条件に保ち、血糖を酸化除去し、残余還元物質について Somogyi-Nelson 法で血中のガラクトーゼを定量することが出来る、と結論している。

第 2 報 網内系填塞剤並びに刺激剤及び肝臓毒による影響について

著者は家兎に墨汁、コロイド銀で網内系を填塞後、ガラクトーゼ負荷試験を行うと、ガラクトーゼ処理能の明らかな減弱が認められ、コンムエン及びハイボンで網内系を刺激すると、ガラクトーゼ処理能は著明に亢進した。しかも此等薬剤は肝細胞機能には殆んど影響を与えないことが証明されている。しかしガラクトーゼは主として肝臓において処理される。従つて星細胞はガラクトーゼ代謝にも重要な役割を演じていることがわかる。

肝臓毒によつて肝障害を起すと、一般に低血糖状態となり、ガラクトーゼの同代処理機能は著明に減弱し、その程度は隣、四塩化炭素及びクロロホルムの順に強くなつた。

従来行われて来た静脈内ガラクトーゼ負荷試験の数種成績判定法の中、全血糖についての判定は、ガラクトーゼ値についての判定法より劣る。ガラクトーゼ負荷後短時間内では障害後に正常時より血中ガラクトーゼ濃度がかえつて低値を示す例もある為、MacLagan の提唱したガラクトーゼ指数 (30 分値+60 分値+90 分値+120 分値) よりも、正常時にガラクトーゼが血中から消失する時間前後の 2 時点におけるガラクトーゼ濃度の和即ちガラクトーゼ残留値による方が優れた判定法である。又障害後ガラクトーゼの血中からの消失遅延を示すのであるから、Althausen の言う或 1 時点におけるガラクトーゼ濃度による判定より、ガラクトーゼ残留値の方が鋭敏な判定法である。更に Colcher 等の Galactose Removal Constant は、ガラクトーゼの血中からの消失過程を示すものであるが、此れと同時間における消失率を求め、比較してみると、全く同じ価値を示す。従つて計算の容易さからガラクトーゼ消失率の方が優る。此等を総合し、ガラクトーゼ残留値及び消失率の両者による成績判定法が最も妥当であると考え、と結論している。